

CERTIFICATE OF VERIFICATION

I, Catherine Grosset-Fournier

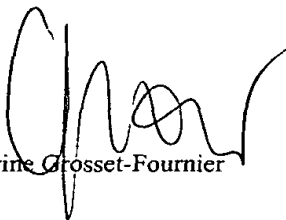
of

GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL
20, rue de Maubeuge
F-75009 PARIS
France

hereby declare

1. that I am competent in the French and English languages,
2. that, to the best of my knowledge and belief, the attached document is a true and complete English translation made by me of the PCT/FR00/01952, and that the said English translation corresponds in all material respects with the French original.

Dated this December 19th, 2001


Catherine Grosset-Fournier

LWDB 3-3 RE. (19)
[01/1]

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 janvier 2001 (18.01.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/04160 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷:
C07K 16/42, A61K 39/395, A61P 9/00, A61K 47/48

[FR/FR]; 10, lotissement La Rose des Vents F-31850
Mortrabe (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/01952

(74) Mandataires: GROSSET-FOURNIER, Chantal etc.;
Grosset-Fournier & Demachy Sarl, 20, rue de Maubeuge,
F-75009 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international: 6 juillet 2000 (06.07.2000)

(25) Langue de dépôt: français

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/08779 7 juillet 1999 (07.07.1999) FR

(81) États désignés (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*):
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange,
F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(84) États désignés (*régional*): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*): PLOUËT,
Jean [FR/FR]; 29, rue Neulet, F-31400 Toulouse (FR).
JOUANNEAU, Jacqueline [FR/FR]; 21, rue Charcot,
F-75013 Paris (FR). THIERY, Jean-Paul [FR/FR]; 16, rue
Vaudrezanne, F-75013 Paris (FR). SAVAGNER, Pierre
[FR/FR]; 16, rue de Condote, F-35760 Saint-Grégoire
(FR). MALAUD, Bernard, André [FR/FR]; 31, rue
Jonquières, F-31500 Toulouse (FR). SORDELLO, Sylvie

Publiée:

— Avec rapport de recherche internationale.

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES OF FIBROBLAST GROWTH FACTORS AND THEIR USE AS MEDICINES

(54) Titre: ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES DES FACTEURS DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES ET LEUR UTILI-
SATION COMME MEDICAMENTS

(57) Abstract: The invention concerns the use of anti-idiotypic antibodies of the fibroblast growth factor (1) and/or anti-idiotypic
antibodies of the fibroblastic growth factor (2), for preparing a medicine for treating pathologies involving endothelial cells implied in
an angiogenic process, either for inhibiting angiogenesis, or for promoting angiogenesis, without affecting the quiescent endothelial
cells, or for preparing a diagnostic product for pathologies involving endothelial cells implied in an angiogenic process.

(57) Abrégé: La présente invention a pour objet l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique
(1) et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique (2), pour la préparation d'un médicament destiné au
traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, soit pour inhiber l'an-
giogénèse, soit pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, ou pour la préparation d'un produit
de diagnostic de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse.

WO 01/04160 A1

ANTICORPS ANTI-IDIOTYPIQUES DES FACTEURS DE CROISSANCE DES FIBROBLASTES ET LEUR UTILISATION COMME MEDICAMENTS.

L'invention a pour objet des anticorps anti-idiotypiques des facteurs de croissance des fibroblastes et leur utilisation comme médicaments.

Les facteurs de croissance des fibroblastes, ou facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs, « fibroblast growth factors ») sont actuellement reconnus comme les acteurs majeurs de l'homéostasie cellulaire. Le rôle des FGFs a été démontré dans l'angiogénèse, la tumorigénèse et les dégénérescences neuronales.

La diminution des FGFs provoque l'apoptose (mort programmée de la cellule), et leur surabondance provoque la multiplication cellulaire.

Les facteurs de croissance des fibroblastes sont une famille de peptides de 16-30 kDa se liant à l'héparine. Des exemples des membres de la famille des FGFs sont : facteur de croissance des fibroblastes acides aFGF (« acidic fibroblast growth factor »)/FGF-1 (Jaye *et al.*, Science 233 : 541, 1986), facteur de croissance des fibroblastes basiques bFGF (« basic fibroblast growth factor »)/FGF-2 (Abraham *et al.*, Science 233 : 545, 1986), int-2/FGF-3 (Smith *et al.*, EMBO J. 7 : 1013, 1988), FGF-4 (Delli-Bovi *et al.*, Cell 50 : 729, 1987), FGF-5 (Zhan *et al.*, Mol. Cell Biol. 8 : 3487, 1988), FGF-6 (Marics *et al.*, Oncogene 4 : 335, 1989) ; FGF-7 (Finch *et al.*, Science 245 : 752, 1989), FGF-8 (Tanaka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 8928, 1992) et FGF-9 (Miyamoto *et al.*, Mol. Cell Biol. 13 : 4251, 1993).

La demande de brevet WO 90/05184 (CHIRON) décrit des compositions contenant des FGFs humains basiques et acides, qui sont acétylés en position amino-terminale. Les demandes WO 96/35708 et WO 96/35716 (HOPKINS UNIVERSITY OF MEDICINE) décrivent respectivement des homologues des facteurs de croissance des fibroblastes 1 et 2.

A ce jour, au moins 18 gènes codant pour des peptides de cette famille ont été identifiés. Quatre gènes différents codent pour des tyrosine kinases transmembranaires identifiées comme des récepteurs des FGFs, appelés FGF-R 1 à 4. Chacun de ces gènes peut générer plusieurs isoformes par épissage optionnel de l'ARN prémessager. La structure de ces gènes est conservée, c'est-à-dire que leur domaine extracellulaire est constitué de 2 ou 3 domaines de type immunoglobuline et d'un domaine intracellulaire doué d'activité tyrosine kinase. Ainsi, l'isoforme de FGF-R1 comportant les 3 domaines de type immunoglobuline (FGF-R1/3 boucles) lie le FGF2 et non le FGF1, alors que

l'isoforme FGF-R1/2 boucles lie avec la même affinité FGF1 et FGF2. Par ailleurs, l'utilisation de l'exon IIIb confère au FGF-R2 (FGF-R2b) la compétence à lier le FGF1 sans lier FGF2, alors que l'utilisation de l'exon IIIc lui confère la compétence à lier FGF1 et FGF2 (Revue Bikfalvi A. Klein S., Pintucci G., Rifkin DM., Endocrine reviews, 1997, 18, 26-45).

Or un facteur de croissance peut induire de nombreux effets différents par exemple la prolifération ou la survie, selon qu'il se lie à l'un ou à l'autre de ses récepteurs. L'immunoneutralisation peut donc avoir des effets bénéfiques en inhibant la prolifération, mais aussi des effets indésirables en diminuant la survie.

L'analyse des fonctions *in vivo* résultant de l'activation de l'un quelconque des récepteurs de facteurs de croissance se liant à l'héparine, tels que les FGFs, se heurte à deux écueils majeurs.

D'une part, la combinaison des interactions entre ligands (tels que les FGFs) et récepteurs est fort complexe, car un facteur de croissance peut se lier à plusieurs récepteurs et de même, plusieurs facteurs de croissance peuvent se lier à un même récepteur. Ainsi, les produits des 18 gènes codant pour les FGFs disposent des produits des 4 gènes codant pour des récepteurs des FGFs.

D'autre part, leur forte affinité pour les glycosaminoglycanes fait que les facteurs de croissance tels que FGF sont séquestrés dans les matrices extracellulaire et ne sont retrouvés qu'au voisinage immédiat de leur lieu de synthèse, ce qui rend difficile l'appréhension de leur rôle *in vivo*.

A ce jour, il n'existe pas d'autres ligands que les FGFs pour chacune des isoformes des récepteurs des FGFs. Etant donné leur séquestration dans les matrices extracellulaires, l'utilisation des FGFs ne permet pas de distinguer *in vivo* la fonction de chacune de ces isoformes, et donc leur rôle réel en physiopathologie.

L'un des buts de l'invention est de proposer l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques de facteurs de croissance à affinité pour l'héparine, permettant de cibler spécifiquement sur l'un ou l'autre de leurs récepteurs, un nouveau type d'agonistes circulants.

L'un des autres aspects de l'invention est de fournir des antagonistes de récepteurs de facteurs de croissance ayant une spécificité appropriée et une longue durée de demi-vie.

L'un des autres buts de l'invention est de fournir des images internes des domaines de liaison des FGFs à leurs récepteurs, qui du fait de leur structure immunoglobulinique sont circulants.

Plus particulièrement, l'un des buts de l'invention est de fournir des images internes des domaines de liaison du FGF1 à FGF-R2b, et du FGF2 à FGF-R1, qui du fait de leur structure immunoglobulinique sont circulants.

L'un des autres buts de l'invention est de proposer l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques pour stimuler ou inhiber l'activité des récepteurs du FGF1 et/ou des récepteurs du FGF2, ou de proposer des vecteurs de médicaments d'intérêt par l'intermédiaire des récepteurs du FGF1 et/ou du FGF2.

La présente invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogenèse, soit pour inhiber l'angiogenèse, soit pour favoriser l'angiogenèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, ou pour la préparation d'un produit de diagnostic de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogenèse.

L'expression "cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogenèse" signifie cellules endothéliales migrant à travers la lame basale et se multipliant.

Pour déterminer si des cellules sont engagées dans un processus d'angiogenèse, on peut avoir recours à l'immunomarquage à l'aide d'anticorps dirigés contre l'intégrine $\beta 3$ (Brooks et al., Cell, 1994, 79 : 1157-1164) ou le VEGF-R2 (Ortega N. *et al.*, American Journal of Pathology, Vol. 151, 1215-1224, 1997).

L'expression "cellules endothéliales quiescentes" signifie cellules endothéliales des vaisseaux adultes normaux, non angiogéniques.

L'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant les cellules endothéliales angiogéniques, par stimulation sélective respective du récepteur FGFR2b et FGF-R1.

L'expression « cellules endothéliales angiogéniques » désigne les cellules impliquées dans un processus d'angiogenèse.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, pour inhiber l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, lequel anticorps anti-idiotypique est couplé à une toxine dont la fonction est de bloquer la traduction des protéines, ladite toxine étant notamment choisie parmi la saporine, la ricine ou bien un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131, ou lequel anticorps anti-idiotypique est sous forme de fragment Fab.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes.

Ainsi, on pourra notamment citer, selon l'invention, l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2 pour la préparation d'un médicament destiné à :

- favoriser l'angiogénèse physiologique pour augmenter la vitesse de la formation des vaisseaux sanguins au cours de la cicatrisation, de la maturation du corps jaune de l'ovaire, et/ou

- favoriser l'angiogénèse au cours de pathologies obstructives des vaisseaux afin de reperfusionner des territoires ischémiés lors de thrombose vasculaire comme notamment dans l'artérite des membres inférieurs et l'infarctus du myocarde, et/ou

- stimuler sélectivement l'activité des récepteurs du FGF1 et/ou du FGF2 dans des pathologies où lesdits récepteurs sont fonctionnellement déficients, et/ou

- inhiber sélectivement l'activité des récepteurs du FGF1 et/ou du FGF2 à l'aide de fragments Fab ou d'anticorps anti-idiotypiques bloquants, et/ou

- retarder ou arrêter le processus de dégénérescence des photorécepteurs de la neuroretine observé au cours des rétinites pigmentaires génétiques ou acquises lors des surdosages de médicaments inhibant la phosphodiesterase dépendant du GMP-cyclique, et/ou

- stimuler la phagocytose des segments externes des bâtonnets par les cellules épithéliales pigmentées de la rétine comme traitement de certaines rétinopathies pigmentaires et des formes sèches de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

De même, on pourra citer, selon l'invention, l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, associés à une toxine ou de fragment Fab d'anticorps anti-idiotypique, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de l'angiogénèse telles que cancer, rétinopathies diabétiques et le rejet de greffes de cornée.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un anticorps anti-idiotypique, notamment monoclonal, et notamment humanisé, du facteur de croissance fibroblastique 1, caractérisé en ce qu'il est respectivement un ligand du récepteur humain FGFR2b.

Plus particulièrement, l'invention concerne un anticorps anti-idiotypique, notamment monoclonal, et notamment humanisé, du facteur de croissance fibroblastique 1, caractérisé en ce qu'il présente les propriétés suivantes :

- il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R2b,
- il est circulant,
- il présente une durée de demi-vie d'environ 23 jours, notamment d'environ 21 jours, et en particulier de 22,5 jours,
- il induit la phosphorylation sur une tyrosine d'une protéine de 140 kDa,
- il induit la prolifération des cellules endothéliales vasculaires,
- il stimule l'angiogénèse,
- il ne provoque pas d'hypotension artérielle.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un anticorps anti-idiotypique, notamment monoclonal, et notamment humanisé, du facteur de croissance fibroblastique 2, caractérisé en ce qu'il est respectivement un ligand du récepteur humain FGF-R1.

Plus particulièrement, l'invention concerne un anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2, notamment monoclonal, et notamment humanisé, caractérisé en ce qu'il présente les propriétés suivantes :

- il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R1,
- il est circulant,

- il présente une durée de demi-vie d'environ 23 jours, notamment d'environ 21 jours, et en particulier de 22,5 jours,
- il induit la phosphorylation sur une tyrosine d'une protéine de 140 kDa,
- il induit la prolifération des cellules endothéliales vasculaires,
- il stimule l'angiogénèse,
- il ne provoque pas d'hypotension artérielle.

Les anticorps anti-idiotypiques du FGF1 de l'invention reconnaissent le récepteur humain FGF-R2b, mais ne reconnaissent pas le récepteur FGF-R1.

Les anticorps anti-idiotypes du FGF2 de l'invention reconnaissent le récepteur humain FGF-R1 mais ne reconnaissent pas le récepteur FGF-R2b.

L'expression « anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 1, caractérisé en ce qu'il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R2b », signifie qu'il active les fonctions de FGF-R2b.

De même, l'expression « anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 2, caractérisé en ce qu'il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R1 », signifie qu'il active les fonctions de FGF-R1.

La spécificité des anticorps anti-idiotypiques de FGF1 vis-à-vis de FGF-R2b peut être déterminée selon le test de compétition avec le FGF1 radioiodé vis-à-vis de sa liaison à des cellules CHO transfectées avec des vecteurs d'expression eucaryote contenant la séquence du récepteur FGF-R2b.

De même, la spécificité des anticorps anti-idiotypiques de FGF2 vis-à-vis de FGF-R1 peut être déterminée selon le test de compétition avec le FGF2 radioiodé vis-à-vis de sa liaison à des cellules CHO transfectées avec des vecteurs d'expression contenant la séquence du récepteur FGF-R1.

L'expression « anticorps anti-idiotypique circulant » signifie véhiculé librement dans le sang circulant et non capté par les parois vasculaires.

A la différence des anticorps anti-idiotypiques FGF1 et FGF2 de l'invention, les facteurs de croissance FGF1 et FGF2 ne sont pas circulants.

L'intérêt de ce que les anticorps anti-idiotypiques de l'invention soient spécifiques et circulants, est de cibler sur les cellules endothéliales angiogéniques des drogues qui n'affectent pas les cellules endothéliales quiescentes.

S'agissant de la durée de demi-vie des anticorps anti-idiotypiques, elle est variable d'une espèce à l'autre.

La durée de demi-vie des anticorps anti-idiotypiques FGF1 ou FGF2 de l'invention, peut être mesurée selon le test suivant : injection intraveineuse du ligand (FGF1 ou FGF2) radioiodé, puis recueil à différents intervalles de temps de sang et comptage de la radioactivité. La durée de demi-vie correspond au temps nécessaire pour que 50% de la radioactivité initiale ait disparu du sang circulant.

La durée de demi-vie du FGF1 est inférieure à 2 minutes ; la durée de demi-vie du FGF2 est inférieure à 2 minutes. A titre indicatif, la durée de demi-vie des IgG est de l'ordre de 23 jours.

La protéine de 140 kDa sur laquelle les anticorps anti-idiotypiques du FGF1 de l'invention induisent la phosphorylation d'une tyrosine est FGF-R2b.

La protéine de 140 kDa sur laquelle les anticorps anti-idiotypiques du FGF2 de l'invention induisent la phosphorylation d'une tyrosine est FGF-R1.

Cet aspect signifie que l'activation de FGF-R2b par les anticorps anti-idiotypiques FGF1, peut déclencher des fonctions, telles que la prolifération, la migration, la résistance à l'apoptose, nécessitant la phosphorylation de FGF-R2b.

De même, l'activation de FGF-R1 par les anticorps anti-idiotypiques FGF2, peut déclencher des fonctions telles que la prolifération, la migration, la résistance à l'apoptose, nécessitant la phosphorylation de FGF-R1.

Cet aspect peut être mesuré par le test de phosphorylation, destiné à vérifier que les anticorps anti-idiotypiques selon l'invention sont fonctionnels, c'est-à-dire qu'ils induisent la phosphorylation au niveau de résidus tyrosine des récepteurs de FGF, faute de quoi il ne peut y avoir de fonctions biologiques telles que la prolifération, la dissociation, l'angiogénèse etc...

Une méthode conventionnelle de mesure de l'activité de phosphorylation du récepteur FGF, par exemple FGF-R1, consiste dans un premier temps, à incuber pendant 24 heures des cellules VSM en milieu sans sérum, puis pendant 10 minutes en présence ou en l'absence de 100 ng/ml de FGF2 ou FGF1, ou 500 µg/ml de Ig2Id F1 ou Ig2Id F2. Les cellules sont ensuite rincées avec une solution de tampon phosphate (PBS) froid puis lysées, et le FGF-R1 est immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti FGF-R1. Le complexe est séparé par électrophorèse sur gel de dodécyle sulfate de sodium (SDS), transféré sur une membrane de nitrocellulose, et la phosphorylation de FGF-R1 est révélée à l'aide d'un anticorps anti-phosphotyrosine.

L'induction de la prolifération des cellules endothéliales vasculaires signifie qu'elles se multiplient. Ceci peut être déterminé selon le test décrit ci-après (voir exemples, paragraphe 3.1 « Mitogénicité »).

La stimulation de l'angiogénèse signifie que la liaison des anticorps anti-idiotypiques FGF1 au récepteur FGF-R2b suivie de la phosphorylation sur une tyrosine de FGF-R2b et de la prolifération cellulaire suffisent à déclencher l'angiogénèse.

De même, la stimulation de l'angiogénèse signifie que la liaison des anticorps anti-idiotypiques FGF2 au récepteur FGF-R1 suivie de la phosphorylation sur une tyrosine de FGF-R1 et de la prolifération cellulaire suffisent à déclencher l'angiogénèse.

Ceci peut être quantifié par le test décrit ci-après (voir exemples, paragraphe 3.3 « Angiogénèse cornéenne »).

L'invention concerne également le fragment Fab des anticorps anti-idiotypiques FGF1 et/ou FGF2 selon l'invention.

L'invention concerne également le complexe entre un anticorps anti-idiotypique selon l'invention (à savoir un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique FGF1 et/ou du facteur de croissance fibroblastique FGF2), et une toxine, en particulier choisie parmi la saporine, la ricine, ou bien un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131, ou le strontium.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou d'un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 2 selon l'invention, caractérisé en ce que:

a) on injecte le facteur de croissance fibroblastique 1 (FGF1) et/ou le facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF2) purifié chez un animal, notamment un lapin,

b) on prélève le sang pour récupérer les immunoglobulines (Ig) purifiées contenant des anticorps anti-FGF1 (Ig1 F1) et/ou anti-FGF2 (Ig1 F2) spécifiques, par exemple par chromatographie d'affinité pour la protéine A puis, on purifie éventuellement les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 spécifiques à partir des Ig purifiées, par exemple par chromatographie d'affinité pour le FGF1 et/ou FGF2,

c) on injecte les susdites Ig purifiées ou les susdites Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 spécifiques et purifiées chez l'animal de la même espèce que celui utilisé lors de l'injection de FGF1 et/ou FGF2, notamment dans les ganglions poplités de lapin de même allotype que celui qui a produit Ig1 F1 et/ou Ig2 F2, lors de l'injection de FGF1 et/ou FGF2,

d) on prélève le sang pour récupérer les Ig totales, par exemple par la protéine A, puis pour soumettre les Ig totales à deux immunoadsorptions :

- une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec les Ig préimmunes du lapin (Ig PI) qui a servi à faire les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2, pour éliminer les anticorps anti-allotypes ou isotypes,

- une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec des Ig1 F1 et/ou des Ig1 F2, pour purifier les anticorps anti-idiotypiques (Ig2Id F1 ou Ig2Id F2).

L'étape a) d'injection du FGF1 ou du FGF2 chez un animal, notamment un lapin, a lieu sous la peau.

L'expression « anticorps anti-FGF1 (Ig1 F1) spécifiques » signifie que les anticorps dirigés contre le FGF1 (anticorps anti-FGF1) ne reconnaissent pas le FGF2 : en effet, on observe moins de 5% de réaction croisée avec FGF2, ce qui signifie qu'il faut au moins 20 fois plus de FGF2 que de FGF1 pour neutraliser la même quantité d'anticorps anti-FGF1. De même que pour les anticorps anti-FGF1 spécifiques, les anticorps anti-FGF2 (Ig1 F2) spécifiques ne reconnaissent pas le FGF1 : en effet, on observe moins de 5% de réaction croisée avec FGF1.

L'invention a également pour objet un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou du facteur de croissance fibroblastique 2, susceptible d'être obtenu selon le procédé suivant :

a) on injecte le facteur de croissance fibroblastique 1 (FGF1) et/ou le facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF2) purifié chez un animal, notamment un lapin,

b) on prélève le sang pour récupérer les immunoglobulines (Ig) purifiées contenant des anticorps anti-FGF1 (Ig1 F1) et/ou anti-FGF2 (Ig1 F2) spécifiques, par exemple par chromatographie d'affinité pour la protéine A puis, on purifie éventuellement les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 spécifiques à partir des Ig purifiées, par exemple par chromatographie d'affinité pour le FGF1 et/ou FGF2,

c) on injecte les susdites Ig purifiées ou les susdites Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 spécifiques et purifiées chez l'animal de la même espèce que celui utilisé lors de l'injection de FGF1 et/ou FGF2, notamment dans les ganglions poplités de lapin de même allotype que celui qui a produit Ig1 F1 et/ou Ig2 F2, lors de l'injection de FGF1 et/ou FGF2,

d) on prélève le sang pour récupérer les Ig totales, par exemple par la protéine A, puis pour soumettre les Ig totales à deux immunoadsorptions :

- une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec les Ig préimmunes du lapin (Ig PI) qui a servi à faire les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2, pour éliminer les anticorps anti-allotypes ou isotypes,

- une immunoadsorption sur une colonne d'affinité préparée avec des Ig1 F1 et/ou des Ig1 F2, pour purifier les anticorps anti-idiotypiques (Ig2Id F1 ou Ig2Id F2).

L'invention a également pour objet un procédé de préparation d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF1 et/ou d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF2 selon l'invention, caractérisé en ce que :

a) on injecte FGF1 et/ou FGF2 à un animal, et notamment à une souris,

b) on récupère les splénocytes de l'animal synthétisant des Ig1 F1 et/ou Ig1 F2,

c) on fusionne les susdits splénocytes avec des cellules de myélome,

d) on sélectionne les hybridomes obtenus à l'issue de l'étape c) précédente en ce qu'ils synthétisent des immunoglobulines dirigées contre FGF1 et/ou FGF2,

e) on injecte les Ig1 F1 et/ou Ig1 F2 ainsi sélectionnés à l'issue de l'étape d) à un animal, et notamment à une souris, de même allotype que celui ayant produit Ig1 F1 et/ou Ig1 F2,

f) on récupère les splénocytes synthétisant des Ig2Id F1 et/ou Ig2Id F2,

g) on fusionne les cellules de la rate (splénocytes) avec des cellules de myélome,

h) on sélectionne les hybridomes obtenus à l'issue de l'étape g) précédente en ce qu'ils synthétisent des Ig2Id F1 dirigés contre Ig1 F1 et/ou des Ig2Id F2 dirigés contre Ig1 F2,

i) on récupère lesdits Ig2Id F1 et/ou des Ig2Id F2.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de préparation décrit ci-dessus, d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF1 et/ou d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF2, les modalités de l'étape a) consistent à injecter à une souris, dans un premier temps, 3 fois par voie sous cutanée à 15 jours d'intervalle, puis une quatrième fois par voie intrapéritonéale ou intraveineuse, le facteur de croissance fibroblastique 1 et/ou le facteur de croissance fibroblastique 2, en une quantité variant de 5 à 50 µg de FGF1 et/ou FGF2.

Après l'étape a) d'injection, on prélève la rate de la souris pour récupérer les splénocytes synthétisant des Ig1F1 et/ou des Ig1 F2. Lors du prélèvement de la rate, on fusionne les splénocytes totaux avec des cellules du myélome. Les cellules hybrides en résultant se multiplient et l'on trie ensuite celles qui sécrètent l'anticorps d'intérêt. Les splénocytes non fusionnés meurent en 8 jours.

L'étape i) de récupération des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention consiste plus particulièrement à :

- sélectionner les anticorps anti-idiotypiques FGF1 par leur capacité d'inhiber la liaison de FGF1 iodé au récepteur FGF-R2b et de pas inhiber la liaison de FGF1 iodé au récepteur FGF-R1,

- sélectionner les anticorps anti-idiotypiques FGF2 par leur capacité d'inhiber la liaison de FGF2 iodé au récepteur FGF-R1 et de pas inhiber la liaison de FGF2 iodé au récepteur FGF-R2b.

Pour préparer les fragments Fab des anticorps anti-idiotypiques FGF1 et/ou FGF2 de l'invention, on peut procéder tel que décrit dans le manuel intitulé « Antibodies, a laboratory manual, 628-629, Harlow and David Lane Editeurs, Cold Spring Harbor Laboratory, 1998 ».

L'invention est également relative à des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent à titre de substance active au moins un anticorps anti-idiotypique FGF1 et/ou FGF2 selon l'invention, ou au moins le fragment Fab selon l'invention ou au moins le complexe selon l'invention, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Les abréviations utilisées ci-dessus, ainsi que dans les exemples et les figures ci-dessous ont les significations suivantes :

PBS : phosphate buffer saline.

Ig : immunoglobulines

IgG : immunoglobulines G

Ig PI : immunoglobulines de lapin purifiées par protéine A-sepharose à partir de sang prélevé avant l'immunisation par FGF1 et/ou FGF2.

Ig1 F1 : immunoglobulines de lapin 1 purifiées par protéine A-sepharose à partir de sang prélevé après immunisation par le FGF1, (anticorps dirigés contre FGF1).

Ig1 F2 : immunoglobulines de lapin 1 purifiées par protéine A-sepharose à partir de sang prélevé après immunisation par le FGF2, (anticorps dirigés contre FGF2).

Ig2Id F1 : immunoglobulines de lapin 2 purifiées par protéine A-sepharose à partir de sang prélevé après l'immunisation par le Ig1 F1, (anticorps anti-idiotypiques de FGF1).

Ig2Id F2 : immunoglobulines de lapin 2 purifiées par protéine A-sepharose à partir de sang prélevé après l'immunisation par le Ig1 F2 (anticorps anti-idiotypiques de FGF2).

FGF-Rs : récepteurs des FGF, par exemple FGF-R1 et FGF-R2b.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques de FGF1 pour :

- stimuler l'activité des récepteurs du FGF1,
- 5 - inhiber l'activité des récepteurs du FGF1 par des anticorps bloquants ou des fragments Fab,
- coupler Ig2Id F1 à des médicaments ou gènes d'intérêt afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF1 et stimuler l'activité de ces récepteurs,
- coupler Ig2Id F1 à des médicaments, toxines ou gènes d'intérêt afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF1 et les détruire,
- 10 - coupler Ig2Id F1 à des traceurs radioactifs afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF1 et les visualiser dans tout système d'imagerie médicale.

Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne l'utilisation d'anticorps anti-idiotypiques de FGF2 pour :

- stimuler l'activité des récepteurs du FGF2,
- 15 - inhiber l'activité des récepteurs du FGF2 par des anticorps bloquants ou des fragments Fab,
- coupler Ig2Id F2 à des médicaments ou gènes d'intérêt afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF2 et stimuler l'activité de ces récepteurs,
- 20 - coupler Ig2Id F2 à des médicaments, toxines ou gènes d'intérêt afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF2 et les détruire,
- coupler Ig2Id F2 à des traceurs radioactifs afin de les vectoriser sur des cellules exprimant les récepteurs du FGF2 et les visualiser dans tout système d'imagerie médicale.
- 25

DESCRIPTION DES FIGURES

Les Figures 1A et 1B représentent la spécificité des anticorps anti-idiotypiques Ig2Id F1 et Ig2Id F2 pour les récepteurs FGF-Rs.

Plus particulièrement, la figure 1A représente la spécificité des anticorps anti-idiotypiques Ig2Id F1 et Ig2Id F2 pour le récepteur FGF-R1/2 boucles, et la figure 1B représente la spécificité des anticorps anti-idiotypiques Ig2Id F1 et Ig2Id F2 pour le récepteur FGF-R1/3 boucles.

L'axe des abscisses des figures 1A et 1B représente la concentration de modulateurs, à savoir la concentration de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2, exprimée en nM.

L'axe des ordonnées de la figure 1A représente la liaison de FGF2 iodé sur FGF-R1/2 boucles (exprimée en %) et, celui de la figure 1B représente la liaison de FGF2 iodé sur FGF-R1/3 boucles (exprimée en %).

Des cellules CHO pgsA-745 transfectées avec FGF-R1/2boucles ou FGF-R1/3 boucles sont inoculées avec les concentrations désirées de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2, et 2 ng/ml de FGF2 radioiodé pendant 3 h à 4°C. Les puits sont ensuite rincés, le tapis cellulaire est ensuite lysé avec NaOH 0.2 M comme décrit ci-dessous.

Dans la figure 1A ainsi que dans la figure 1B, la courbe comportant le losange noir (♦) correspond à FGF2, la courbe comportant le triangle noir (▲) correspond à Ig2Id F1, et la courbe comportant le carré noir (■) correspond à Ig2Id F2.

La Figure 2 représente la prolifération des cellules musculaires lisses d'aorte (VSM), et plus particulièrement, l'action proliférative des anticorps anti-idiotypiques Ig2Id F1 et Ig2Id F2 sur lesdites cellules.

L'axe des abscisses de la figure 2 représente la concentration de modulateurs, à savoir la concentration de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 ; la concentration de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 étant exprimée en nM.

L'axe des ordonnées de la figure 2 représente le nombre de cellules VSM par puits ($\times 10^{-3}$).

La courbe comportant le losange noir (♦) correspond à FGF2, la courbe comportant le carré noir (■) correspond à Ig2Id F1, et la courbe comportant le triangle noir (▲) correspond à Ig2Id F2.

Les cellules VSM sontensemencées à faible densité (5000 cellules/puits) dans des boîtes de 24 puits. Des doses variables de FGF2, Ig2Id F1 ou Ig2Id F2 sont ajoutées après adhésion des cellules au plastique de culture. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. Les cellules sont trypsinisées et comptées au quatrième jour.

La Figure 3 représente l'inhibition de l'action mitogénique des Ig2Id (anticorps anti-idiotypiques FGF1 et/ou FGF2) par les anticorps Ig1 F1 et Ig1 F2 sur les cellules VSM.

Les histogrammes gris (voir celui du côté gauche) correspondent à l'absence d'anticorps, les histogrammes hachurés (voir celui du milieu) correspondent à la présence d'anticorps anti-FGF2 (Ig1 F2) et, les histogrammes noirs avec des points blancs (voir celui de droite) correspondent à la présence d'anticorps anti-FGF1 (Ig1 F1).

L'axe des abscisses représente respectivement, de gauche à droite : la mise en présence du contrôle ou des Ig1 F1 ou des Ig1 F2 respectivement avec le contrôle, avec FGF2, avec Ig2Id F2, avec FGF1, avec Ig2Id F1.

L'axe des ordonnées de la figure 3 représente le nombre de cellules VSM par puits ($\times 10^{-3}$).

Les cellules VSM sontensemencées à faible densité (5000 cellules/puits) dans des boîtes de 24 puits. 5 ng/ml de FGF1 ou FGF2 ou, 20 μ g/ml de Ig2Id F1 ou Ig2Id F2 sont ajoutées après l'adhésion des cellules au plastique de culture en présence ou absence de 50 μ g/ml de Ig1 F1 ou Ig1 F2. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. Les cellules sont trypsinisées et comptées au quatrième jour.

Les Figures 4A et 4B représentent respectivement la prolifération des cellules NBT-II et NBT-II/R1, et plus particulièrement, l'action proliférative des anticorps anti-idiotypiques Ig2Id F1 et Ig2Id F2 sur lesdites cellules.

L'axe des abscisses des figures 4A et 4B représente la concentration de modulateurs, à savoir la concentration de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2, exprimée en ng/ml.

L'axe des ordonnées des figures 4A et 4B représente le nombre de cellules par puits ($\times 10^{-3}$).

La courbe comportant le losange noir (\blacklozenge) dans les figures 4A et 4B correspond à FGF1, et courbe comportant le carré noir (\blacksquare) dans les figures 4A et 4B correspond à Ig2Id F1.

La courbe comportant le triangle noir (\blacktriangle) de la figure 4B correspond à FGF2, et la courbe comportant la croix de la figure 4B correspond à Ig2Id F2.

Les cellules NBT-II ou NBT-II/R1 sontensemencées à 5000 cellules/puits dans des boîtes de 24 puits. Des doses variables de FGF1, FGF2, Ig2Id F1 ou Ig2Id F2 sont

ajoutées après adhésion des cellules au plastique de culture. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. Les cellules sont trypsinisées et comptées au quatrième jour.

La Figure 5 représente la dissociation des cellules NBT-II et NBT-II/R1.

Les cellules NBT-II ou NBT-II/FGF-R1 sontensemencées à faible densité dans des plaques de 12 puits (5000 cellules par puits). Le lendemain les modulateurs, à savoir FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 sont ajoutés au milieu et, au quatrième jour les cellules sont observées et photographiées au microscope inversé à contraste de phase NIKON diaphot.

La Figure 6 représente l'angiogénèse cornéenne.

Les rectangles gris (à gauche) correspondent au score d'angiogénèse au jour J7, et les rectangles hachurés (à droite) correspondent au score d'angiogénèse au jour J14.

L'axe des abscisses représente respectivement, de gauche à droite, le contrôle, FGF2, Ig2Id F1, Ig2Id F2.

L'axe des ordonnées représente le score d'angiogénèse.

Une incision de 3 mm de long, intéressant la moitié de l'épaisseur cornéenne, est réalisée au dôme cornéen, sous microscope opératoire. Le stroma cornéen est clivé, en directions diamétralement opposées, jusqu'à 2 mm du limbe. Les implants, préalablement réhydratés par 2 µl de PBS contenant 30 µg de Ig2Id F1 et Ig2Id F2. Après 14 jours, la néovascularisation est quantifiée. Chaque modulateur a été étudié dans au moins 4 globes oculaires de 4 lapins distincts (8 lenticules). Les différences de score d'angiogénèse entre chaque condition et les lenticules contrôles sont évaluées par le test du t de Student.

Les Figures 7A et 7B représentent respectivement la croissance tumorale des cellules NBT-II et NBT-II/R1 chez la souris nude.

L'axe des abscisses des figures 7A et 7B représente le nombre de jours après l'implantation chez la souris nude, et l'axe des ordonnées représente le volume tumoral (en mm³).

La courbe comportant le carré noir (■) correspond à Ig2Id F2, la courbe comportant le triangle noir (▲) correspond à Ig2Id F1, et celle comportant le losange noir (◆) correspond au contrôle.

3,5 millions de cellules NBT-II ou NBT-II/R1 sont injectés sous la peau du flanc droit de 2 groupes de 30 souris nude femelles âgées de 6 semaines. 4 jours plus tard, chacun des 2 groupes précédents est divisé en 3 groupes de 10 souris par tirage au sort et les dimensions des éventuelles tumeurs sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse.

5 500 µg de Ig2Id F1 ou de Ig2Id F2 dilués dans un volume final de 100 µl de tampon phosphate + gélatine (2mg/ml) sont injectés par voie intraveineuse au niveau des veines de la queue. Cette injection est répétée tous les 3 jours pendant 50 jours. Les mesures sont réalisées aux mêmes intervalles par un opérateur ignorant le traitement reçu par chaque groupe de souris dans chacun des 6 groupes.

METHODES D'ETUDE

EXEMPLE :

1. Fabrication d'anticorps anti-idiotypiques de FGF1 et FGF2

1-1 Fabrication d'anticorps préimmuns (Ig PI).

Avant chaque immunisation, du sang est prélevé, le sérum est fractionné immédiatement après le recueil et 15 ml de sérum sont chromatographiés sur une colonne de protéine A (0,9 x 18 cm). La colonne est lavée par du PBS et les immunoglobulines sont éluées par de la glycine 0,2 M tamponnée à pH 2,5,

20 immédiatement neutralisées par adjonction de 1/5 du volume de K₂HPO₄ 1 M, puis dialysées contre du PBS. Les immunoglobulines (Ig PI) sont conservées à - 80 °C jusqu'à leur utilisation.

1-2 Fabrication d'anticorps anti-FGF1 (Ig F1) et anti-FGF2 (Ig F2).

100 µg de FGF1 sont émulsionnés dans 0.25 ml d'adjuvant de Freund complet puis injectés chez un lapin, 4 fois à 15 jours d'intervalle. Le sang prélevé entre 3 et 7 mois après la première injection est fractionné et les Ig sont purifiées par chromatographie d'affinité pour la protéine A (Ig1 F1). Ces anticorps neutralisent

30 l'activité du FGF1 sans inhiber celle du FGF2.

Selon le même protocole il a été fabriqué des anticorps neutralisants anti-FGF2 (Ig1 F2) qui ne neutralisent pas l'activité du FGF1.

1-3 Fabrication d'anticorps anti-idiotypiques de FGF1 (Ig2Id F1) et de FGF2 (Ig2Id F2).

Les animaux sont prémédiqués, et 1 ml d'une solution de Bleu Evans est injectée dans la plante des pattes arrières ; 15 minutes plus tard les lapins sont anesthésiés. Les creux poplités sont rasés et désinfectés à la Bétadine. Une incision horizontale de 2 cm, centrée sur le creux poplité est faite aux ciseaux, puis les espaces cellulaires sont dilacérés. De un à trois ganglions de 2 mm de diamètre sont repérés grâce à leur coloration bleue et 10 µg d'Ig1 F1 mélangé volume à volume avec de l'adjuvant complet de Freund y est injecté à l'aide d'une micro-seringue de Hamilton sous un volume final de 100 µl et une quantité d'anticorps primaire de 20 µg. La technique est répétée au niveau de l'autre patte.

De quatre à cinq rappels toutes les trois semaines sont effectués de manière percutanée en utilisant une émulsion volume à volume de l'immunogène (Ig1F1 ou Ig1F2) et d'adjuvant incomplet de Freund. Les prélèvements sanguins de 40 ml sont réalisés toutes les trois semaines du 4^{ème} mois au 9^{ème} mois.

Le sang prélevé entre 4 et 7 mois après la première injection est purifié comme décrit précédemment. Les Ig anti-idiotypes (Ig2Id F1) sont alors purifiées par chromatographie d'affinité pour la protéine A.

Selon le même protocole il a été injecté des Ig1 F2 qui ont donné lieu à la formation d'anticorps anti-idiotypiques du FGF2 (Ig2 F2).

Le tri et/ou la purification des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention est effectué tel que décrit précédemment, en soumettant les Ig totales à deux immunoadsorptions (voir étape d) décrite précédemment dans le procédé de préparation des anticorps anti-idiotypiques).

2. Etude de la spécificité des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention.

Des cellules CHO pgsA 745 natives ou transfectées par FGF-R1/2 boucles ou FGF-R1/3 boucles ensemencées à 30 000 cellules par puits de 2 cm² sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 10% de sérum de veau foetal, 100 UI/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine.

La liaison de FGF2 radioiodé (1.10^5 à 2.10^5 cpm/ng) aux cellules transfectées est mesurée à 4 °C. Les cellules sont lavées 2 fois avec du tampon de liaison (DMEM contenant 20 mM Hepes (Acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N'-2-éthane sulfonique) et

2 mg/ml de gélatine ajustée à un pH de 7,4). 2 ng/ml de FGF2 iodé sont ajoutés avec des concentrations variables de FGF1 ou de FGF2 non marqué ou d'Ig2Id F1 ou Ig2Id F2 sous un volume final de 0.5 ml.

La liaison non spécifique est déterminée en présence d'un excès (500 ng) de FGF2 purifié. Les liaisons totales et non spécifiques sont déterminées en double. Après deux heures, les cellules sont lavées 3 fois avec du tampon froid et lysées avec 0.5 ml de NaOH 0.2 M. L'iode 125 contenu dans le matériel solubilisé est compté dans un compteur gamma.

3. Activités biologiques des anticorps anti-idiotypiques selon l'invention

3.1 Mitogénicité

Les cellules musculaires lisses d'aorte (VSM) sontensemencées à faible densité (5000 cellules/puits) dans des boîtes de 24 puits. Les modulateurs FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2, sont ajoutés après adhésion des cellules au plastique de culture, et après 2 jours. Chaque condition est étudiée dans deux puits différents. Les cellules sont trypsinisées et comptées au quatrième jour.

Ig2Id F1 et IG2Id F2 déclenchent un effet mitogène sur les cellules VSM.

3.2 Différenciation cellulaire

Les cellules NBT-II ou NBT-II/FGF-R1 sontensemencées à faible densité dans des plaques de 12 puits (5000 cellules par puits). Le lendemain, FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 sont ajoutés au milieu, et au quatrième jour les cellules sont observées et photographiées au microscope inversé à contraste de phase NIKON diaphot.

3.3 Angiogenèse cornéenne

Les lapins prémédiqués sont anesthésiés. L'œil est extériorisé et immobilisé à l'aide d'une membrane de latex, porteuse en son centre d'une fente de 1 cm de long. Une incision de 3 mm de long, intéressant la moitié de l'épaisseur du stroma cornéen est réalisée au dôme cornéen, sous microscope opératoire (microscope OPMI, Zeiss). Le stroma cornéen est clivé, en directions diamétralement opposées, jusqu'à 2 mm du limbe. Les implants préalablement réhydratés par 20 µl de la solution à tester sont insérés (FGF2 200 ng, Anticorps anti-idiotypiques ou anticorps contrôles 40 µg).

L'apparition de néovaisseaux, naissant de la vascularisation limbique est étudiée en simple aveugle (sans connaissance du numéro du lapin, correspondant à la substance étudiée) après 7 et 14 jours sous anesthésie générale, et quantifiée en fonction d'une échelle à 5 niveaux ou score d'angiogénèse.

Score 0 = absence de néovaisseaux,

Score 1 = néovaisseaux n'atteignant pas la demi distance séparant l'implant du limbe,

Score 2 = néovaisseaux atteignant la demi distance,

Score 3 = néovaisseaux dépassant la demi distance mais n'envahissant pas l'implant,

Score 4 = atteinte et envahissement de l'implant par les néovaisseaux.

Les lapins sont ensuite sacrifiés et les globes oculaires prélevés et fixés dans du liquide de Bouin, aux fins d'analyses histologiques.

Chaque modulateur (FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2) a été étudié dans au moins 4 globes oculaires de 4 lapins distincts (8 lenticules). Les différences de score d'angiogénèse entre chacune des conditions testées et les lenticules contrôles sont évaluées par le test du t de Student.

3.4 Croissance tumorale

Croissance chez la souris nude de la lignée de carcinome vésical

Les cellules NBT-II et NBT-II/FGF-R1 sont décollées des plastiques de culture à l'aide de trypsine-EDTA, homogénéisées, centrifugées et mises en suspension dans du milieu de culture additionné de 10% de sérum de veau foetal. 1ml correspondant à 3,5 millions de cellules, est injecté sous la peau du flanc droit de chaque souris. La viabilité de la suspension est vérifiée au préalable par coloration vitale au bleu trypan ; le colorant est exclu de plus de 99% des cellules. 2 groupes de 30 souris nude femelles âgées de 6 semaines ont été implantées avec des cellules NBT-II ou NBT-II/FGF-R1.

4 jours plus tard, chacun des 2 groupes précédents est divisé en 3 groupes de 10 souris par tirage au sort. Les dimensions des éventuelles tumeurs sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse électronique et, les modulateurs (FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2) dans un volume final de 100 µl de tampon phosphate + gélatine (2mg/ml), sont injectés par voie intraveineuse au niveau des veines de la queue (Anticorps anti-idiotypiques FGF1 et FGF2 : 500 µg, Anticorps non-immuns : 500 µg / injection).

Les injections sont répétées deux fois par semaine, les mesures sont réalisées aux mêmes intervalles par un opérateur ignorant le traitement reçu par chaque groupe de souris dans chacun des 6 groupes.

Au terme de ces trois types d'études chez la souris nude, les animaux sont sacrifiés. Les tumeurs et certains organes sains (rein, foie, vessie) sont prélevés et conservés pour moitié dans du liquide de conservation (FAE : Formol 4%, Ethanol 40%, Acide Acétique 10%, H₂O qsp 100%) et pour moitié sont congelés par immersion dans l'azote liquide après protection par l'iso-thiopentane.

4. Résultats

4.1 Spécificité des Ig2Id F1 et Ig2Id F2 pour les FGF-Rs (Figures 1A et 1B)

Les ligands naturels FGF1 et FGF2 inhibent la liaison de FGF2 iodé sur FGF-R1/2 boucles. L'image interne Ig2Id F1 de FGF1 inhibe la liaison de FGF2 iodé aux cellules CHO transfectées par FGF-R1/2 boucles alors que l'image interne Ig2IdF2 de FGF2 inhibe la liaison de FGF2 iodé aux cellules CHO transfectées soit par FGF-R1/2 boucles soit par FGF-R1/3 boucles.

Compte tenu d'une fraction spécifique estimée à 1% des immunoglobulines obtenues après purification sur protéine A, les inhibitions observées sont comparables en terme de molarité. Le plateau est obtenu avec 10 ng/ml (0,5 nM) de FGF2 et 10 µg/ml (0,6 nM) de Ig2Id F1 et Ig2Id F2.

En revanche ni FGF1 ni Ig2Id F1 n'inhibent la liaison de FGF2 iodé à FGF-R1/3 boucles. Le plateau est atteint à 3 nM de FGF2 ou Ig2Id F2.

Ig2Id F2 est donc une image interne de FGF2 et Ig2Id F1 est une image interne de FGF1.

4.2 Prolifération cellulaire (Figures 2, 3, 4A et 4B).

Culture primaire VSM (Figure 2) : FGF1 et FGF2 induisent une prolifération dose-dépendante.

Ig2Id F1 et Ig2Id F2 ont des effets comparables à ceux de FGF2. Les croissances maximales sont obtenues pour 1,2 nM.

La preuve de la nature anti-idiotypique est apportée par l'observation que l'action mitogène de Ig2Id F1 (comme FGF1) est inhibée par Ig1 F1 mais pas par Ig1 F2. En revanche Ig2Id F2 est inhibé par Ig1 F2 mais pas par Ig1 F1 (Figure 3).

Lignées NBT-II et NBT-II/FGF-R1 (Figures 4A et 4B) : ni FGF2 ni Ig2Id F2 n'inhibent la croissance des cellules NBT-II puisque ces cellules n'expriment pas le récepteur FGF-R1. Bien que ces cellules expriment le récepteur FGF-R2, Ig2Id F1 n'inhibe pas la prolifération alors que FGF1 (0,05 nM) le fait.

5 A l'inverse FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 induisent une diminution du nombre de cellules NBT-II/FGF-R1, correspondant à 30% des valeurs des puits contrôles.

4.3 Différenciation cellulaire et effet de dissociation (Figure 5).

10 La différenciation cellulaire est comparée dans le sens de l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux sous l'effet des FGFs.

On observe que ni FGF2, ni Ig2Id F2 n'induisent la différenciation des cellules NBT-II puisqu'elles n'expriment pas le récepteur FGF-R1.

Ig2Id F1 et FGF1 induisent la dissociation des cellules NBTII.

15 A l'inverse, FGF1, FGF2, Ig2Id F1 et Ig2Id F2 induisent une dissociation des cellules NBT-II/FGFR1.

4.4 Angiogenèse cornéenne (Figure 6).

20 Dans le modèle d'angiogenèse cornéenne, les immunoglobulines contrôles non immunes entraînent de manière inconstante (15% des cas) une angiogenèse mineure à l'origine d'un score moyen de 0,4 à J15, comparable à celui obtenu en saturant les lenticules avec une protéine porteuse (Sérum albumine bovine).

10 pm/ implant de FGF1 et FGF2 induisent une angiogenèse significative (scores de 2,35 et 2,05 respectivement).

25 Ig2Id F1 et Ig2Id F2 à la dose de 4 pm/implant entraînent une angiogenèse (scores de 1,3 et 1,85 respectivement à J15) significativement supérieure à celle obtenue avec les immunoglobulines contrôles ($p < 0,05$).

La cinétique d'apparition des néo-vaisseaux apparaît différente de celle obtenue avec le ligand naturel.

30 A J7, le FGF2 atteint le seuil de significativité statistique avec 80% de l'effet maximal, alors que les effets induits par Ig2Id F1 et Ig2Id F2 sont à 10% et 41% des scores maximum.

Ig2Id F1 et Ig2Id F2 induisent une angiogenèse comme les ligands FGF1 et FGF2.

4.5 Croissance tumorale (Figure 8).

Ni Ig2Id F1 ni Ig2Id F2 n'affectent la croissance des xénogreffes de cellules NBT-II.

5. En revanche, si la croissance des cellules NBT-II/FGF-R1 n'est pas affectée par Ig2Id F1, elle est inhibée par Ig2Id F2, ce qui reproduit l'effet inhibiteur de la prolifération observé in vitro après l'inoculation de FGF2 ou de Ig2Id F2.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, soit pour inhiber l'angiogénèse, soit pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, ou pour la préparation d'un produit de diagnostic de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse.
2. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 selon la revendication 1, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant les cellules endothéliales angiogéniques, par stimulation sélective du récepteur FGFR2b.
3. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 selon l'une des revendications 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse, pour inhiber l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes, lequel anticorps anti-idiotypique est couplé à une toxine dont la fonction est de bloquer la traduction des protéines, ladite toxine étant notamment choisie parmi la saporine, la ricine ou bien un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131, ou lequel anticorps anti-idiotypique est sous forme de fragment Fab.
4. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 selon l'une des revendications 1 ou 2, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies impliquant des cellules endothéliales engagées dans un processus d'angiogénèse pour favoriser l'angiogénèse, sans affecter les cellules endothéliales quiescentes.
5. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 4, pour la préparation d'un médicament destiné à :

- favoriser l'angiogénèse physiologique pour augmenter la vitesse de la formation des vaisseaux sanguins au cours de la cicatrisation, de la maturation du corps jaune de l'ovaire, et/ou

- favoriser l'angiogénèse au cours de pathologies obstructives des vaisseaux afin de reperfusionner des territoires ischémiés lors de thrombose vasculaire, comme notamment dans l'artérite des membres inférieurs et l'infarctus du myocarde, et/ou

- stimuler sélectivement l'activité des récepteurs du FGF1 dans des pathologies où lesdits récepteurs sont fonctionnellement déficients, et/ou

- inhiber sélectivement l'activité des récepteurs du FGF1 à l'aide de fragments Fab ou d'anticorps anti-idiotypiques bloquants, et/ou

- retarder ou arrêter le processus de dégénérescence des photorécepteurs de la neuroretine observé au cours des rétinites pigmentaires génétiques ou acquises lors des surdosages de médicaments inhibant la phosphodiesterase dépendant du GMP-cyclique, et/ou

- stimuler la phagocytose des segments externes des bâtonnets par les cellules épithéliales pigmentées de la rétine comme traitement de certaines rétinopathies pigmentaires et des formes sèches de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

6. Utilisation d'anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1 selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, associés à une toxine ou de fragment Fab d'anticorps anti-idiotypique, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies nécessitant l'inhibition de l'angiogénèse telles que cancer, rétinopathies diabétiques et le rejet de greffes de cornée.

7. Anticorps anti-idiotypique, notamment monoclonal, et notamment humanisé, du facteur de croissance fibroblastique 1, caractérisé en ce qu'il est respectivement un ligand du récepteur humain FGFR2b.

8. Anticorps anti-idiotypique selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il présente les propriétés suivantes :

- il est spécifique vis-à-vis du récepteur FGF-R2b,
- il est circulant,
- il présente une durée de demi-vie d'environ 23 jours, notamment d'environ 21 jours, et en particulier de 22,5 jours,

- il induit la phosphorylation sur une tyrosine d'une protéine de 140 kDa,
- il induit la prolifération des cellules endothéliales vasculaires,
- il stimule l'angiogénèse,
- il ne provoque pas d'hypotension artérielle.

9. Fragment Fab d'un anticorps anti-idiotypique selon la revendication 7 ou la revendication 8.

10. Complexe entre un anticorps anti-idiotypique selon la revendication 7 ou la revendication 8 et une toxine, en particulier choisie parmi la saporine, la ricine, ou bien un élément radioactif tel que l'iode 125 ou 131, ou le strontium.

11. Procédé de préparation d'un anticorps anti-idiotypique du facteur de croissance fibroblastique 1 selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisé en ce que:

a) on injecte le facteur de croissance fibroblastique 1 (FGF-1) purifié chez un animal, notamment un lapin,

b) on prélève le sang pour récupérer les immunoglobulines Ig purifiées contenant des anticorps anti-FGF-1 (Ig1 F1) spécifiques, par exemple par chromatographie d'affinité pour la protéine A puis, on purifie éventuellement les Ig1 F1 spécifiques à partir des Ig purifiées, par exemple par chromatographie d'affinité pour le FGF-1,

c) on injecte les susdites Ig purifiées ou les susdites Ig1 F1 spécifiques et purifiées chez l'animal de la même espèce que celui utilisé lors de l'injection de FGF-1, notamment dans les ganglions poplités de lapin de même allotype que celui qui a produit Ig1 F1, lors de l'injection de FGF-1,

d) on prélève le sang pour récupérer les Ig totales, par exemple par la protéine A, puis pour soumettre les Ig totales à deux immunoabsorptions :

- une immunoabsorption sur une colonne d'affinité préparée avec les Ig préimmunes du lapin (Ig PI) qui a servi à faire les Ig1 F1, pour éliminer les anticorps anti-allotypes ou isotypes,

- une immunoabsorption sur une colonne d'affinité préparée avec des Ig1 F1, pour purifier les anticorps anti-idiotypiques (Ig2Id F1).

12. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal anti-idiotypique de FGF1 selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisé en ce que :

- a) on injecte FGF-1 à un animal, et notamment à une souris,
- b) on récupère les splénocytes de l'animal synthétisant des Ig1 F1,
- c) on fusionne les susdits splénocytes avec des cellules de myélome,
- d) on sélectionne les hybridomes obtenus à l'issue de l'étape c) précédente en ce qu'ils synthétisent des immunoglobulines dirigées contre FGF-1,
- e) on injecte les Ig1 F1 ainsi sélectionnés à l'issue de l'étape d) à un animal, et notamment à une souris, de même allotype que celui ayant produit Ig1 F1,
- f) on récupère les splénocytes synthétisant des Ig2Id F1,
- g) on fusionne les cellules de la rate (splénocytes) avec des cellules de myélome,
- h) on sélectionne les hybridomes obtenus à l'issue de l'étape g) précédente en ce qu'ils synthétisent des Ig2Id F1 dirigés contre Ig1 F1,
- i) on récupère lesdits Ig2Id F1.

13. Compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent à titre de substance active au moins un anticorps anti-idiotypique selon la revendication 7 ou la revendication 8, ou au moins le fragment Fab selon la revendication 9 ou au moins le complexe selon la revendication 10, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

1/6

Figure 1A

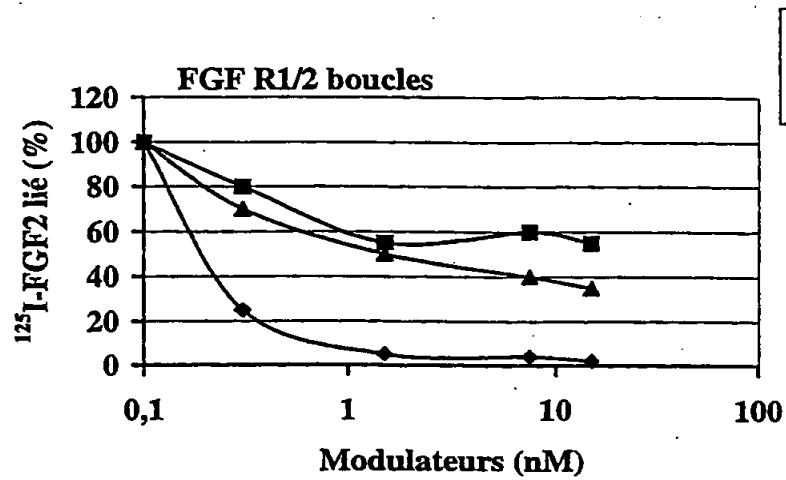
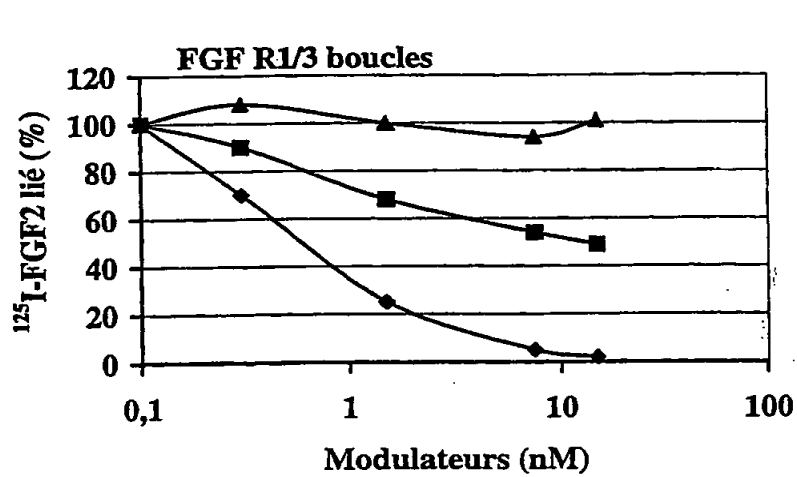


Figure 1B



2/6

Figure 2

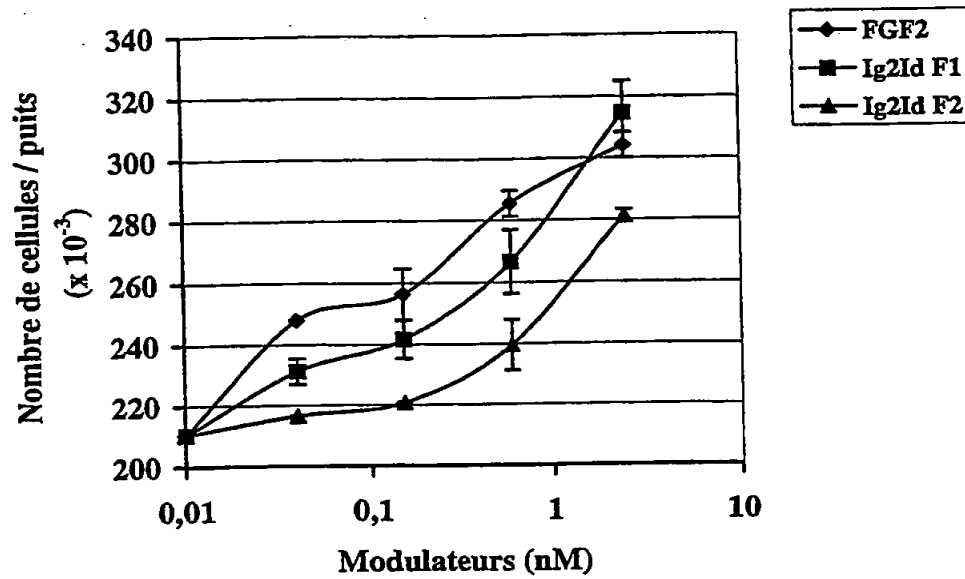
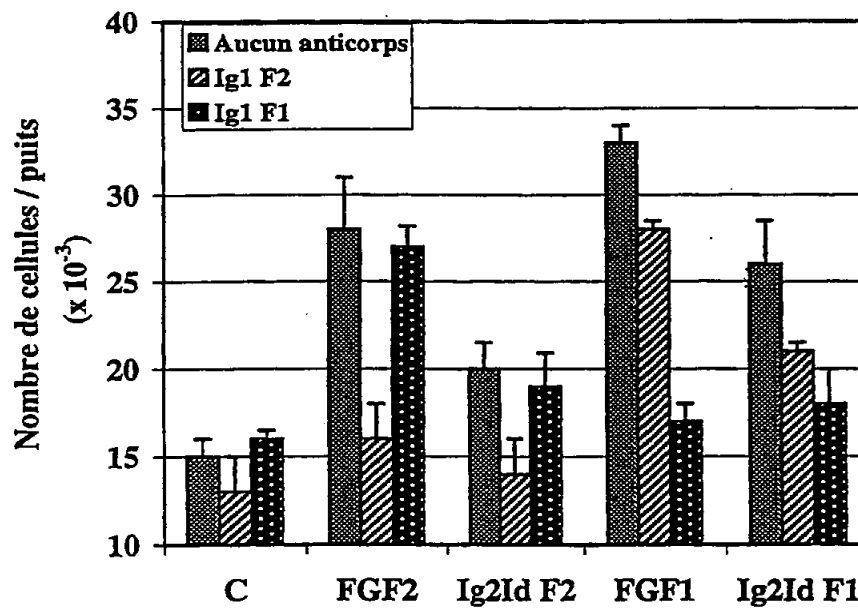


Figure 3



3/6

Figure 4A

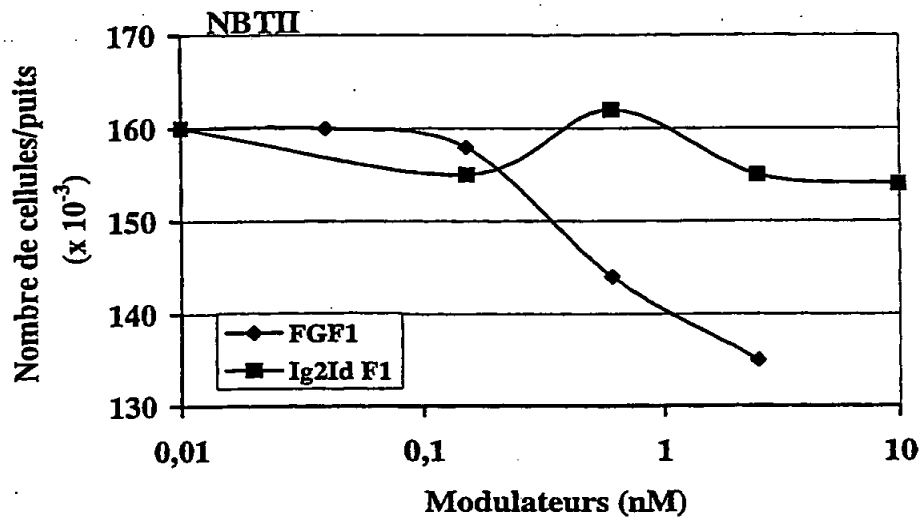
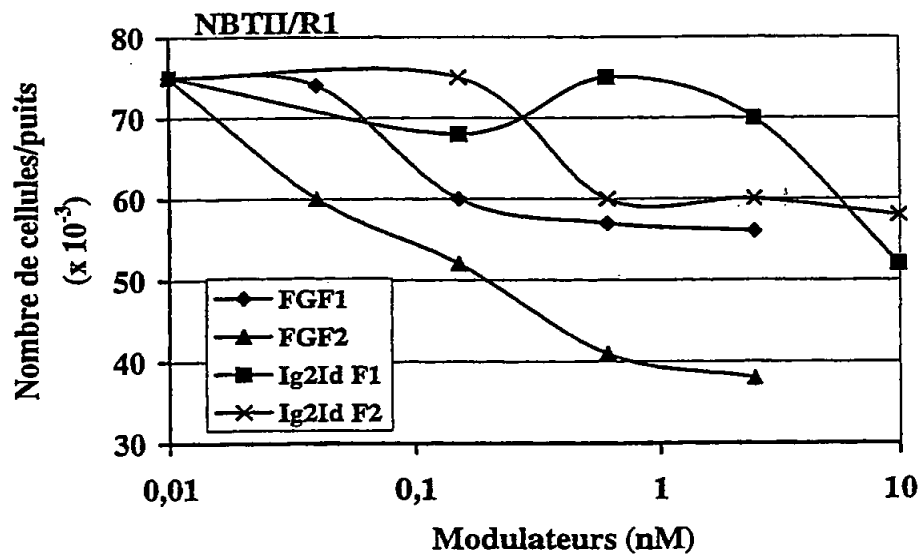
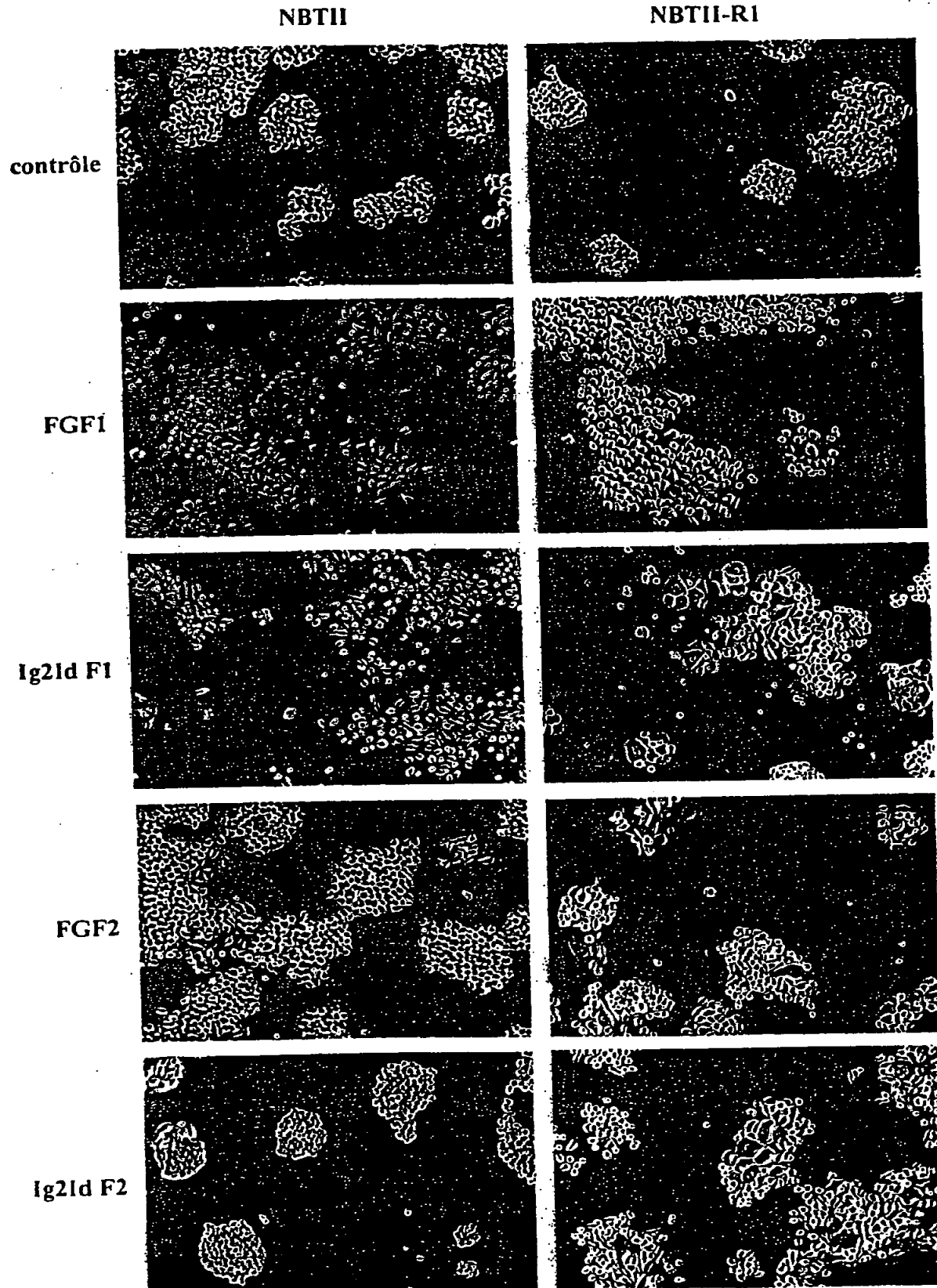


Figure 4B



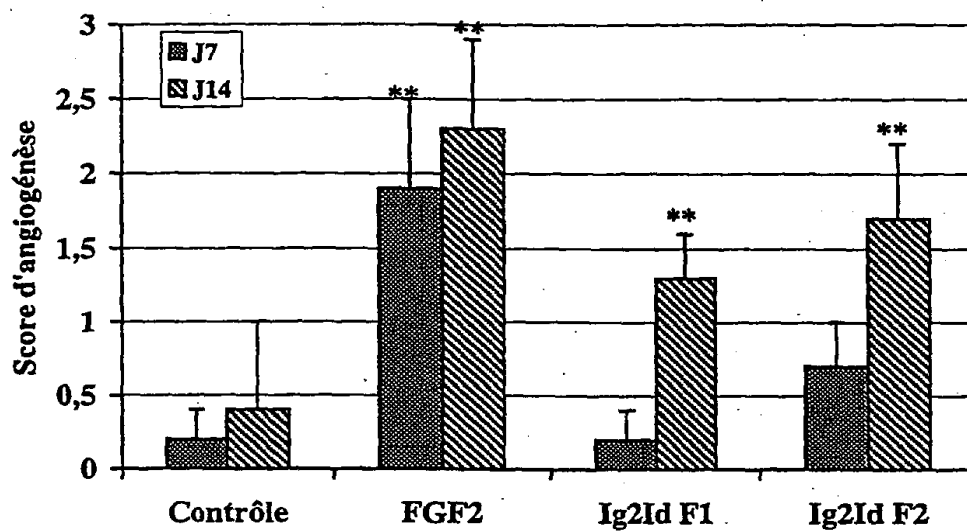
4/6

Figure 5



5/6

Figure 6



6/6

Figure 7A

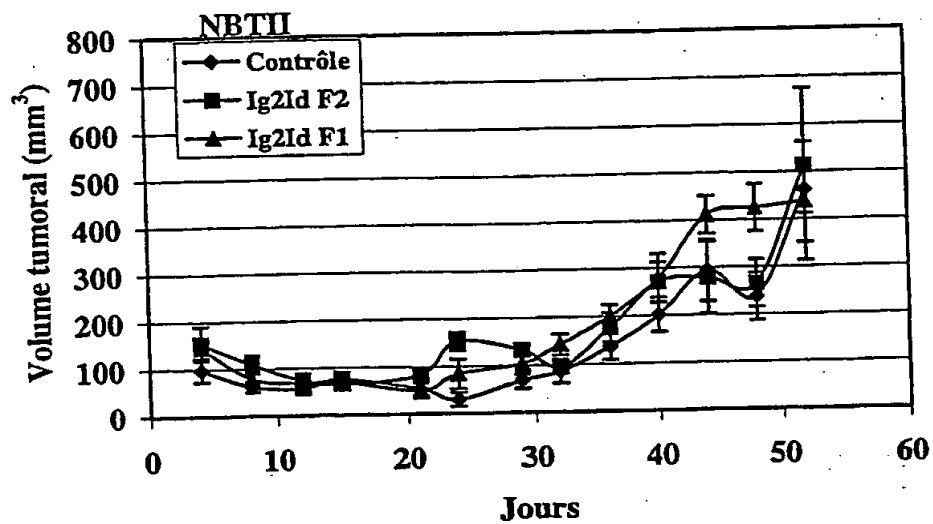
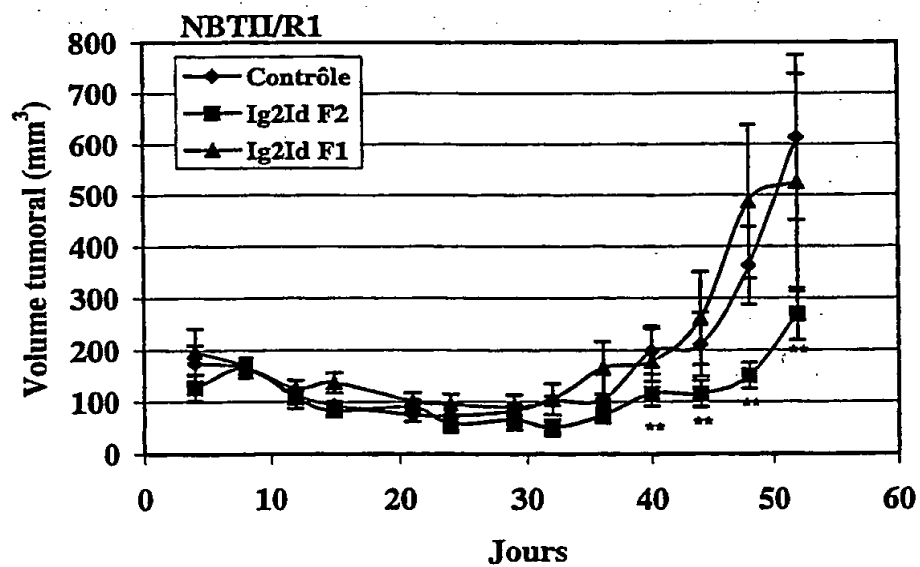


Figure 7B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No
PCT/FR 00/01952

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/42 A61K39/395 A61P9/00 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ORTEGA N ET AL: "Modulation de la progression tumorale par des anticorps anti-idiotypiques de facteurs angiogéniques." COMPTES RENDUS DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES. SÉRIE III, SCIENCES DE LA VIE, vol. 319, no. 5, May 1996 (1996-05), pages 411-5, XP000601935- page 412, left-hand column, line 60 - line 64	1,2,4-6
Y	---	3,7-13
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 2000

Date of mailing of the international search report

30/10/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern/ Application No.
PCT/FR 90/01952

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DIKOV M ET AL: "A functional fibroblast growth factor-1 immunoglobulin fusion protein." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 25, 19 June 1998 (1998-06-19), pages 15811-7, XP002131796/ page 15812, right-hand column, line 65 -page 15814, right-hand column, line 22 page 15816, right-hand column, line 10	3,7-13
X	FR 2 742 662 A (CNRS) 27 June 1997 (1997-06-27) claims 1-15	1-3,10
A	WO 98 21237 A (PRAECIS PHARMACEUTICALS INCORPORATED) 22 May 1998 (1998-05-22) page 3, line 2 - line 7	1-13
A	PLOUET J ET AL: "VEGF dependent tumoral progression: stimulation by anti VEGF idiotypic antibodies." JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY. SUPPLEMENT 18A, 1994, page 328 XP000602723 abstract EZ3111	1-13
P,A	WO 99 45018 A (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED) 10 September 1999 (1999-09-10) page 1 -page 3; claims 1-56	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP/01952

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2742662 A	27-06-1997	EP 0868434 A WO 9723510 A JP 2000506501 T	07-10-1998 03-07-1997 30-05-2000
WO 9821237 A	22-05-1998	AU 5357798 A EP 0941247 A	03-06-1998 15-09-1999
WO 9945018 A	10-09-1999	AU 2994599 A EP 1032583 A	20-09-1999 06-09-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No

PCT/FR/01952

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K16/42 A61K39/395 A61P9/00 A61K47/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ORTEGA N ET AL: "Modulation de la progression tumorale par des anticorps anti-idiotypiques de facteurs angiogéniques." COMPTES RENDUS DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES. SÉRIE III, SCIENCES DE LA VIE, vol. 319, no. 5, mai 1996 (1996-05), pages 411-5, XP000601935 page 412, colonne de gauche, ligne 60 - ligne 64	1,2,4-6
Y	---	3,7-13
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 98/01952

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>DIKOV M ET AL: "A functional fibroblast growth factor-1 immunoglobulin fusion protein." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 25, 19 juin 1998 (1998-06-19), pages 15811-7, XP002131796 page 15812, colonne de droite, ligne 65 -page 15814, colonne de droite, ligne 22 page 15816, colonne de droite, ligne 10</p>	3,7-13
X	<p>FR 2 742 662 A (CNRS) 27 juin 1997 (1997-06-27) revendications 1-15</p>	1-3, 10
A	<p>WO 98 21237 A (PRAECIS PHARMACEUTICALS INCORPORATED) 22 mai 1998 (1998-05-22) page 3, ligne 2 - ligne 7</p>	1-13
A	<p>PLOUET J ET AL: "VEGF dependent tumoral progression: stimulation by anti VEGF idiotypic antibodies." JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY. SUPPLEMENT 18A, 1994, page 328 XP000602723 abrégé EZ3111</p>	1-13
P,A	<p>WO 99 45018 A (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED) 10 septembre 1999 (1999-09-10) page 1 -page 3; revendications 1-56</p>	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demar internationale No

PCT/FR 01952

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2742662	A	27-06-1997	EP 0868434 A	07-10-1998
			WO 9723510 A	03-07-1997
			JP 2000506501 T	30-05-2000
WO 9821237	A	22-05-1998	AU 5357798 A	03-06-1998
			EP 0941247 A	15-09-1999
WO 9945018	A	10-09-1999	AU 2994599 A	20-09-1999
			EP 1032583 A	06-09-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demar internationale No
PCT/FR 00/01952

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K16/42 A61K39/395 A61P9/00 A61K47/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07K A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ORTEGA N ET AL: "Modulation de la progression tumorale par des anticorps anti-idiotypiques de facteurs angiogéniques." COMPTES RENDUS DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES. SÉRIE III, SCIENCES DE LA VIE, vol. 319, no. 5, mai 1996 (1996-05), pages 411-5, XP000601935 page 412, colonne de gauche, ligne 60 - ligne 64	1,2,4-6
Y	--- -/--	3,7-13

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

23 octobre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/10/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 00/01952

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>DIKOV M ET AL: "A functional fibroblast growth factor-1 immunoglobulin fusion protein." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 25, 19 juin 1998 (1998-06-19), pages 15811-7, XP002131796 page 15812, colonne de droite, ligne 65 -page 15814, colonne de droite, ligne 22 page 15816, colonne de droite, ligne 10</p>	3,7-13
X	<p>FR 2 742 662 A (CNRS) 27 juin 1997 (1997-06-27) revendications 1-15</p>	1-3,10
A	<p>WO 98 21237 A (PRAECIS PHARMACEUTICALS INCORPORATED) 22 mai 1998 (1998-05-22) page 3, ligne 2 - ligne 7</p>	1-13
A	<p>PLOUET J ET AL: "VEGF dependent tumoral progression: stimulation by anti VEGF idiotype antibodies." JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY. SUPPLEMENT 18A, 1994, page 328 XP000602723 abrégé EZ3111</p>	1-13
P,A	<p>WO 99 45018 A (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED) 10 septembre 1999 (1999-09-10) page 1 -page 3; revendications 1-56</p>	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs au...membre...familles de brevets

Demande internationale No

PCT/...00/01952

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2742662 A	27-06-1997	EP 0868434 A WO 9723510 A JP 2000506501 T	07-10-1998 03-07-1997 30-05-2000
WO 9821237 A	22-05-1998	AU 5357798 A EP 0941247 A	03-06-1998 15-09-1999
WO 9945018 A	10-09-1999	AU 2994599 A EP 1032583 A	20-09-1999 06-09-2000

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire WOB99CNRFGF1	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 01952	Date du dépôt international(jour/mois/année) 06/07/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 07/07/1999
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.



Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

- a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.
- ☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.
- b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :
- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.
2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.



Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant



le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

suggérée par le déposant.



parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.



parce que cette figure caractérise mieux l'invention.





Aucune des figures n'est à publier.

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire WOB99 AE CNR FGI		POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01952		Date du dépôt international (jour/mois/année) 06/07/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 07/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C07K16/42			
Déposant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE			
<p>1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.</p> <p>2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.</p> <p><input type="checkbox"/> Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).</p> <p>Ces annexes comprennent feuilles.</p>			
<p>3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Base du rapport II <input type="checkbox"/> Priorité III <input type="checkbox"/> Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle IV <input type="checkbox"/> Absence d'unité de l'invention V <input checked="" type="checkbox"/> Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration VI <input checked="" type="checkbox"/> Certains documents cités VII <input checked="" type="checkbox"/> Irrégularités dans la demande internationale VIII <input checked="" type="checkbox"/> Observations relatives à la demande internationale 			
Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 02/02/2001		Date d'achèvement du présent rapport 19.09.2001	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Fonctionnaire autorisé Renggli, J N° de téléphone +49 89 2399 7461 	

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01952

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17))*):

Description, pages:

1-22 version initiale

Revendications, N°:

1-13 version initiale

Dessins, feuilles:

1/6-6/6 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01952

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-13
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-13
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-13
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée

VI. Certain documents cités

1. Certains documents publiés (règle 70.10)
et / ou

2. Divulgations non écrites (règle 70.9)

voir feuille séparée

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées :
voir feuille séparée

VIII. Observations relatives à la demande internationale

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01952

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins
et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée

Section V:

1. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1 ORTEGA N ET AL: 'Modulation de la progression tumorale par des anticorps anti-idiotypiques de facteurs angiogéniques.' COMPTES RENDUS DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES. SÉRIE III, SCIENCES DE LA VIE, vol. 319, no. 5, mai 1996 (1996-05), pages 411-5, XP000601935
- D2 FR-A-2 742 662 (CNRS) 27 juin 1997 (1997-06-27)
- D3 DIKOV M ET AL: 'A functional fibroblast growth factor-1 immunoglobulin fusion protein.' JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 25, 19 juin 1998 (1998-06-19), pages 15811-7, XP002131796

2. Application industrielle (Art. 33(4) PCT):

Le contenu des revendications 1-13 est susceptible d'application industrielle.

3. Nouveauté (Art. 33(2) PCT):

Aucun de documents cités ne décrit des anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1. Les revendications 1-13 sont donc nouvelles par rapport à D1-D3.

4. Activité inventive (Art. 33(3) PCT):

Les documents D1 et D2, qui sont considérés comme les documents de l'état de la technique les plus proches, décrivent des anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 2 et/ou de VGEF (voir D1, résumé et D2, revendications).

Ces documents démontrent également l'utilité thérapeutique et l'aspect pratique d'anticorps anti-idiotypiques dirigés contre des facteurs participant aux phénomènes associés à l'angiogénèse (voir parties expérimentales de D1 et D2).

Le problème que se propose de résoudre la revendication 1 par rapport à D1 et D2 peut donc être considéré comme étant la mise au point d'un médicament alternatif permettant de favoriser ou inhiber l'angiogénèse.

La solution proposée dans la revendication 1 de la présente demande, soit l'utilisation d' anticorps anti-idiotypiques du facteur de croissance fibroblastique 1, n'est pas considérée comme inventive (article 33(3) PCT) pour les raisons suivantes:

Le document D3 indique clairement que le facteur de croissance fibroblastique 1 est associé à des maladies impliquant l'angiogénèse. L'homme du métier désirant mettre au point une alternative au médicament de D1 et D2 considérerait donc l'emploi du facteur de croissance fibroblastique 1 comme une alternative évidente. La revendication 1 n'est donc pas inventive. Il est noter qu'aucune difficulté technique n'a été rencontrée dans le développement des anticorps de la présente demande puisque les protocoles suivis sont standards dans le domaine.

Les revendications 2-6 résultent de processus de sélection non-inventifs.

Les revendications 7-13 ne vont pas au-delà des documents D1 et D2 et elles ne sont donc pas inventives (voir D1, méthodes d'études et D2, revendications 9-15).

Section VI

Certains documents publiés (règle 70.10)

Demande n° Brevet n°	Date de publication (jour/mois/année)	Date de dépôt (jour/mois/année)	Date de priorité (valablement revendiquée) (jour/mois/année)
WO 99/45018	10.09.1999	08.03.1999	06.03.1998

Cet examen est fondé sur l'hypothèse que toutes les revendications jouissent d'un droit de priorité datant du dépôt du document de priorité. S'il s'avérait qu'il n'en était pas ainsi, le document ci-dessous cité dans le rapport de recherche internationale pourrait devenir pertinent pour juger de la nouveauté et de l'activité inventive de la présente demande. L'attention du demandeur est de plus attiré sur

le fait que ce document est au bénéfice d'une date de priorité antérieure à la présente demande.

Section VII

Contrairement à ce qu'exige la règle 5.1 a) ii) PCT, la description n'indique pas l'état de la technique antérieure pertinent exposé dans les documents D1-D3 et ne cite pas ces documents.

Section VIII

1. La revendication 1 concerne une deuxième application médicale ainsi qu'une utilisation simple pour produire un produit diagnostique (voir dernière partie de la revendication suivant le terme "ou"). Ce mélange de catégories de revendications aurait dû être évité.
2. La caractéristique technique "circulant" semble superflue pour définir l'anticorps de la revendication 8, puisque ladite caractéristique ne semble pas impliquer que l'anticorps ait une forme et/ou structure particulière (Art. 6 PCT).
3. Le terme "FGFR2b", utilisé dans la revendications 2, 7 et 8, n'a pas de signification bien établie et reconnue et laisse un doute quant à la signification de la caractéristique technique à laquelle il se réfère. L'objet desdites revendications n'est donc pas clairement défini (article 6 PCT). Aucune référence à un tel récepteur n'a pu être trouvée dans l'art antérieur à disposition.
4. La caractéristique technique "protéine de 140 kDa" est considérée comme obscure prise isolément (Directives PCT, Gazette PCT- Section IV, III-4.1, 4.2) et devrait être clarifiée. De plus, il n'est pas clair où une telle phosphorylation a été démontrée dans la demande. Cette dernière objection s'applique aussi à la caractéristique technique concernant la demi-vie des anticorps de la revendication 8.
5. Le terme "respectivement" semble superflu dans la revendication 7 (Art. 6 PCT).

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/030042

Applicant's or agent's file reference WOB99CNRFGF1	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01952	International filing date (day month year) 06 July 2000 (06.07.00)	Priority date (day month year) 07 July 1999 (07.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 16/42		
Applicant CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement
- VI ☒ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 February 2001 (02.02.01)	Date of completion of this report 19 September 2001 (19.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01952

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

☐ the international application as originally filed.

☐ the description. pages 1-22 . as originally filed.
 pages _____ . filed with the demand.
 pages _____ . filed with the letter of _____
 pages _____ . filed with the letter of _____

☐ the claims. Nos. 1-13 . as originally filed.
 Nos. _____ . as amended under Article 19.
 Nos. _____ . filed with the demand.
 Nos. _____ . filed with the letter of _____
 Nos. _____ . filed with the letter of _____

☐ the drawings. sheets/fig 1/6-6/6 . as originally filed.
 sheets/fig _____ . filed with the demand.
 sheets/fig _____ . filed with the letter of _____
 sheets/fig _____ . filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description. pages _____
☐ the claims. Nos. _____
☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-13	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations**1. The following documents are referred to:**

D1 ORTEGA N. ET AL.: "Modulation de la progression tumorale par des anticorps anti-idiotypiques de facteurs angiogéniques", COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES, SERIE III, SCIENCES DE LA VIE, Vol. 319, N° 5, May 1996 (1996-05), pages 411-5, XP000601935

D2 FR-A-2 742 662 (CNRS) 27 June 1997 (1997-06-27)

D3 DIKOV M. ET AL.: "A functional fibroblast growth factor-1 immunoglobulin fusion protein", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 273, N° 25, 19 June 1998 (1998-06-19), pages 15811-7, XP002131796.

2. Industrial Applicability (PCT Article 33(4)):

The content of Claims 1-13 is industrially applicable.

3. Novelty (PCT Article 33(2)):

None of the cited documents describes anti-idiotypical fibroblast growth factor-1 antibodies. Claims 1-13 are

therefore novel in relation to D1-D3.

4. Inventive Step (PCT Article 33(3)):

D1 and D2, which are considered to represent the closest prior art, describe anti-idiotypical antibodies of fibroblast growth factor-2 and/or VEGF (see D1, summary, and D2; claims).

These documents also demonstrate the therapeutic benefit and practical aspect of anti-idiotypical antibodies used against factors involved in the phenomena associated with angiogenesis (see experimental parts of D1 and D2).

Thus, in view of D1 and D2, the problem addressed by Claim 1 can be considered to be that of providing an alternative drug enabling angiogenesis to be promoted or inhibited. A person skilled in the art wishing to provide an alternative to the drugs defined in D1 and D2 would therefore consider the use of fibroblast growth factor-1 as an obvious alternative. Consequently, Claim 1 is not inventive. It should be noted that no difficulty was encountered in producing the antibodies of the present application since the protocols used are standard in this field.

Claims 2-6 are the result of non-inventive selection processes.

Claims 7-13 do not go beyond D1 and D2 and they are therefore not inventive (see D1, study methods; and D2, Claims 9-15).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No
PCT/FR 00/01952

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX VI

The present examination is based on the assumption that all the claims enjoy a priority right arising on the filing date of the priority document. Should this prove to be incorrect, the above-mentioned document [WO 99/45018], which is cited in the international search report, could become relevant to the assessment of the novelty and inventive step of the present application. The applicant should also note that this document enjoys a priority date that is earlier than the present application.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01952

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not indicate the relevant prior art disclosed in D1-D3, nor does it mention these documents.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01952

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claim 1 concerns a second medical use, as well as a use for making a diagnostic product (see last part of the claim, after the word "or"). This combination of different categories of claim should have been avoided.
2. The technical feature "circulating" appears to be superfluous to the definition of the antibody of Claim 8, since this feature does not appear to imply that the antibody has a specific form and/or structure (PCT Article 6).
3. The term "FGFR2b", as used in Claims 2, 7 and 8, has no well-established and recognised meaning and it creates doubt as to the significance of the technical feature to which it refers. Consequently, the subject matter of these claims is not clearly defined (PCT Article 6). No reference to this receptor has been found in the available prior art.
4. The technical feature "protein of 140 kDa", considered in isolation, is deemed to be obscure (PCT Examination Guidelines, Chapter III-4.1 and 4.2) and requires clarification. Furthermore, it is not clear where such phosphorylation has been demonstrated in the application. The latter objection also applies to the technical feature concerning the half-life of the antibodies of Claim 8.
5. The word "respectively" appears to be superfluous in Claim 7 (PCT Article 6).

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 07 mai 2001 (07.05.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/01952	Référence du dossier du déposant ou du mandataire WOB99CNRFGF1
Date du dépôt international (jour/mois/année) 06 juillet 2000 (06.07.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 07 juillet 1999 (07.07.99)
Déposant PLOUËT, Jean etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

02 février 2001 (02.02.01)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
 34, chemin des Colombettes
 1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 579177
FR 9908779

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	ORTEGA N ET AL: "Modulation de la progression tumorale par des anticorps anti-idiotypiques de facteurs angiogéniques." COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES. SÉRIE III, SCIENCES DE LA VIE, vol. 319, no. 5, mai 1996 (1996-05), pages 411-5, XP000601935 ✓ * page 412, colonne de gauche, ligne 60 - ligne 64 *	1,2,4-6, 8,10, 13-15
Y		3,7,11, 12
Y	FR 2 742 662 A (CNRS) 27 juin 1997 (1997-06-27) * revendications 1-15 *	3,11,12
Y	WO 98 21237 A (PRAECIS PHARMACEUTICALS INCORPORATED) 22 mai 1998 (1998-05-22) * page 3, ligne 2 - ligne 7 *	7
A	DIKOV M ET AL: "A functional fibroblast growth factor-1 immunoglobulin fusion protein." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 273, no. 25, 19 juin 1998 (1998-06-19), pages 15811-7, XP002131796 ✓ * page 15812, colonne de droite, ligne 65 - page 15814, colonne de droite, ligne 22 * * page 15816, colonne de droite, ligne 10 *	1-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
		C07K A61K A61P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
29 février 2000		Le Flao, K
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non écrite P : document intercalaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement
nationalFA 579177
FR 9908779

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	PLOUET J ET AL: "VEGF dependent tumoral progression: stimulation by anti VEGF idiotypic antibodies." JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY. SUPPLEMENT 18A, 1994, page 328 XP000602723/ abrégé EZ3111	1-15
T	WO 99 45018 A (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED) 10 septembre 1999 (1999-09-10) * page 1 - page 3; revendications 1-56 *	1-15
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
29 février 2000		Le Flao, K
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO.**

FA 579177
FR 9908779

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets,
ni de l'Administration française

29-02-2000

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2742662 A	27-06-1997	EP 0868434 A WO 9723510 A	07-10-1998 03-07-1997
WO 9821237 A	22-05-1998	AU 5357798 A EP 0941247 A	03-06-1998 15-09-1999
WO 9945018 A	10-09-1999	AU 2994599 A	20-09-1999